

硫酸软骨素蛋白多糖在视网膜变性大鼠中的表达

黄玉苗 高朋芬 杨丽霞

【摘要】 目的 研究硫酸软骨素蛋白多糖(CSPGs)在碘酸钠(NaIO_3)诱导的视网膜色素上皮(RPE)细胞变性大鼠中的表达情况。方法 实验研究。24只Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为4组,正常对照组、造模7d组、造模14d组、造模28d组,每组6只。造模组腹腔注射3% NaIO_3 (100 mg/kg);取眼球做病理检查,苏木素-伊红(HE)染色及细胞凋亡检测,验证视网膜变性动物模型的建立;免疫荧光法观察视网膜变性大鼠视网膜上CSPGs表达的时空规律;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测CSPGs多功能蛋白聚糖(Versican) mRNA的表达情况;免疫组织化学法观察视网膜上小胶质细胞表达的巨噬细胞特异性抗原CD68的分布特点。多组比较采用单因素方差分析,两样本间比较采用独立样本 t 检验。结果 注射 NaIO_3 后,模型大鼠视网膜出现变性改变,且光感受器发生渐进性凋亡,造模7、14、28d组凋亡率分别为(21.0±3.5)%、(32.3±2.3)%、(41.7±2.6)%,各组间差异有统计学意义($F=205.27, P<0.01$)。造模7d组,CS-56、CD68在脉络膜、视锥视杆层、内核层、节细胞层表达;造模14d组,CS-56、CD68进一步出现在外核层;造模28d组,CSPGs继续迁移到外丛状层。随造模时间延长,各层荧光表达逐渐增强,CD68在视网膜各层的表达也明显增多,强度分别为:1.33±0.52、2.67±0.82、4.00±1.10和7.17±1.33,各组间差异有统计学意义($F=38.45, P<0.01$)。造模组Versican mRNA表达(1.02±0.06)显著高于正常对照组(0.23±0.02),差异有统计学意义($t=-26.05, P<0.01$)。结论 在碘酸钠诱导的视网膜变性动物模型中,随时间延长CSPGs表达范围扩大,表达量增加,并与小胶质细胞分布在大致相同区域,提示CSPGs可能来源于小胶质细胞。

【关键词】 蛋白硫酸软骨素类; 碘酸盐; 视网膜炎,色素性; 小神经胶质细胞

The expression of chondroitin sulfate proteoglycans in the retinas of retinitis pigmentosa rats

HUANG Yu-miao, GAO Peng-fen, YANG Li-xia. Department of Ophthalmology, Teaching Hospital of Fujian Medical University (Fuzhou General Hospital), Fuzhou 350025, China

Corresponding author: YANG Li-xia, Email: YLX0915-fj@hotmail.com

【Abstract】 Objective To study the expression of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) in retinal pigment epithelium cell degeneration rat induced by sodium iodate (NaIO_3) intraperitoneal injection. **Methods** In this experimental study, a total of 24 Sprague-Dawley (SD) rats were used. And divided into control group, 7 days group, 14 days group and 28 days group, with 6 rats in each group. NaIO_3 (3%, 100 mg/kg) was intraperitoneally injected in 18 rats to establish the retinal degeneration models. HE and Tunel assay were performed to evaluate the retinal degeneration. The expression of CSPGs in rat retinas was detected by immunofluorescence; the expression of Versican mRNA was analyzed by retrovirus-polymerase chain reaction (RT-PCR). The macrophage-specific antigen CD68, secreted by microglia, was detected by an immunohistochemical method. The data was statistically analyzed by one-way ANOVA and independent samples t test. **Results** HE showed morphological retinal degeneration in rats after NaIO_3 injection. The apoptosis of photoreceptors appeared more severe with the development of retinal degeneration in rat retinas after NaIO_3 injection. The apoptosis rates were (21.0±3.5)%, (32.3±2.3)% and (41.7±2.6)% in 7 days, 14 days and 28 days groups, respectively, after NaIO_3 injection, with statistically significant differences between each group ($F=205.27, P<0.01$). CS-56 and CD68 appeared in the choroid, photoreceptor outer segment debris zone (DZ), the

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2012.05.006

基金项目:福建省青年科技人才基金(2006F3104)

作者单位:350025 福州,福建医科大学福总临床医学院眼科

通信作者:杨丽霞,Email:YLX0915-fj@hotmail.com

internuclear layer (INL) and the ganglion cell layer (GCL) 7 days after NaIO_3 injection and spread to the outer nuclear layer (ONL) 14 days after NaIO_3 injection. Twenty-eight days after NaIO_3 injection, CSPGs continued to expand to the outer plexiform layers (OPL). With the passage of time after NaIO_3 injection, CS-56 fluorescence and CD68 intensity became stronger in each layer. CD68 intensity was 1.33 ± 0.52 , 2.67 ± 0.82 , 4.00 ± 1.10 and 7.17 ± 1.33 in normal rat retinas, 7 days, 14 days and 28 days after NaIO_3 injection, and there were statistically significant differences between each group ($F=38.45$, $P<0.01$). The expression of Versican mRNA, the N-terminal fragment of CSPGs, in the retinal degeneration animals was 1.02 ± 0.06 , which was significantly higher than in the control rats (0.23 ± 0.02) ($t=-26.05$, $P<0.01$). **Conclusion** With the passage of time after NaIO_3 injection, the range of CSPGs continued to expand and the expression intensity became stronger in rat retinas. The same distribution of CSPGs and microglia suggested that microglia constitute a source of CSPGs in the degenerating rat retina.

【Key words】 Proteochondroitin Sulfates; Iodates; Retinitis, pigmentosa; Microglia

硫酸软骨素蛋白多糖 (chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs) 是胶质瘢痕的主要组分, 作为一种抑制性细胞外基质分子在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中广泛存在, 并在 CNS 损伤后表达升高^[1]。视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞变性是中枢神经系统变性疾病, 以视网膜光感受器和 RPE 细胞进行性退行病变, 伴以神经胶质增生为主要特征^[2]。目前研究发现 CSPGs 不仅在正常视网膜发育过程中起重要作用^[3], 并且存在于皇家外科学院大鼠 (Royal College of Surgeons rat, RCS rat) 外节中, 抑制轴突再生, 干预干细胞在视网膜上的迁移、整合及分化^[4]。而对于 CSPGs 在碘酸钠 (NaIO_3) 诱导的视网膜变性动物模型中的表达罕见报道, 本研究旨在探索视网膜变性动物模型视网膜中 CSPGs 的表达特点。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 实验动物及分组 成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 24 只, 雌雄不限, 鼠龄 4 周, 体重 150~200 g, 由福州南京军区总院比较医学科提供, 饲养条件遵照视觉与眼科学研究协会关于眼科和视觉研究饲养和使用动物的标准^[5]。动物饲养于 50 lm、12 h 明/12 h 暗循环光照的动物房内, 给予适量食物和饮水。随机分为 4 组, 第一组是正常对照组, 其余是造模组, 分别为碘酸钠注射后 7、14、28 d 组, 每组 6 只。造模组行腹腔注射新配制的 3% NaIO_3 (100 mg/kg), 正常对照组行腹腔注射等量生理盐水。

1.1.2 主要试剂 NaIO_3 (上海生工生物技术服务有限公司), Tunel 试剂盒 (瑞士 Roche 公司), CS-56 (美国 Sigema-Aldrich 公司), CD68 (北京博奥深生物技术有限公司), 二步法免疫组化试剂盒、FITC 标记山

羊抗小鼠 IgG、DAPI、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 组织学标本制备 经腹腔注射新鲜配制的 3% NaIO_3 (100 mg/kg) 建立视网膜变性动物模型。造模 7、14、28 d 时, 采用 10% 水合氯醛 (360 mg/kg) 深麻醉后, 用生理盐水、4% 多聚甲醛各 150 ml 行左室快速滴注。完整摘除眼球, 置于 4% 多聚甲醛中继续固定 1 h, 经 30% 蔗糖水 4 °C 过夜脱水, 至组织块沉于蔗糖溶液中, 取中周部视网膜行冰冻切片, 片厚 10 μm 。常规进行伊红-苏木素 (HE) 染色。

1.2.2 细胞凋亡检测 用脱氧核糖核酸转移酶介导的缺口末端标记 (terminal deoxynucleotide mediated nick end labeling, TUNEL) 试剂盒检测视网膜细胞凋亡。实验步骤按试剂盒操作说明进行。实验分组同上, 并设置阴性对照组 (加不含 TDT 的反应液) 和阳性对照组 (加 DNase I)。方法如下: 羊血清封闭液中常温下孵育 10 min; 通透液冰上孵育 2 min; 滴加 TUNEL 检测液, 37 °C 孵育 1 h; 滴加过氧化物酶标记的抗荧光素抗体 37 °C 下避光反应 30 min; 苏木素染核; 光学显微镜下观察、拍照。结果判定: 凋亡细胞细胞核呈棕黄色, 普通光学显微镜随机选取 5 个高倍视野, 计算凋亡细胞数, 并算出凋亡细胞数与总细胞数的比值, 即凋亡率。

1.2.3 免疫荧光 冰冻切片室温下晾干, 正常羊血清封闭 37 °C 30 min, 甩干; 滴加一抗 CS-56 (1:100) 4 °C 过夜孵育, PBS 代替一抗作为阴性对照; PBS 漂洗后, 滴加荧光二抗, 37 °C 1.5 h, 漂洗后, 用 DAPI 染核, 封片剂封片, 在荧光显微镜下观察、照相。

1.2.4 免疫组化 免疫组织化学操作步骤采用中杉金桥 SP 试剂盒。冰冻切片室温下晾干; 3% H_2O_2 室温

孵育 10 min;滴加一抗 CD68(1:50) 4 ℃过夜孵育, PBS 代替一抗作为阴性对照;增强剂 37 ℃孵育 20 min;PBS 漂洗后,滴加生物素标记羊抗兔 IgG 二抗,37 ℃孵育 1.5 h;漂洗后,用苏木素染核,中性树胶封片,光学显微镜下观察、拍照。结果判定:阳性细胞呈棕黄色,普通光学显微镜随机选取 5 个高倍视野,应用十三点评分法计算阳性细胞数:0 分,无阳性细胞;1 分,小于 10%;2 分,大于 10%小于 50%;3 分,大于 50%小于 80%;4 分,大于 80%。染色强度按阴性、弱、中、强染色分别评为 0~3 分。表达值以阳性细胞数与染色强度的乘积表示。取 5 个视野的平均值作为一张片的计数值,最后再统计分析。

1.2.5 RT-PCR 实验分为正常对照组和造模组,取造模后 28 d 的视网膜,trizol 法从视网膜中提取总 RNA,cDNA 的合成和 PCR 扩增按照逆转录试剂盒说明书进行。引物:Versican 上游引物:5'-GTGATAGGAAAGGCACGGAAAG-3',下游引物:5'-TGAACCCATCTGCATACCAAAG-3';β-Actin 上游引物:5'-ATCATGT-TTGAGACCTTCAACA-3';下游引物:5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCTA-3'。扩增产物长度:MDR1:Versican:207 bp;β-Actin:318 bp。反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s;57 ℃退火 30 s;72 ℃延伸 30 s;扩增 35 个循环;72 ℃再延伸 10 min。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳 30 min,电泳结果用 Quantity One 图像分析系统进行摄像分析。结果以目的基因和 β-Actin 灰度值的比值来作为目的基因的相对表达水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD *t* 法。两样本间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苏木素-伊红染色结果

对照组视网膜结构清晰、完整,RPE 细胞排列规整、致密,视锥视杆层分布均匀,内、外核层排列整齐(见图 1A)。与对照组相比,造模 7 d 组,RPE 选择性损伤、消失,外核层排列紊乱;造模 14 d 组,视锥视杆层空泡化,内、外核层细胞间隙增大,排列紊乱;造模 28 d 组,病变程度加重,部分光感受器细胞向 Bruch 膜迁移,包裹视锥视杆层,正常组织与病变组织掺杂(见图 1B)。

2.2 细胞凋亡检测结果

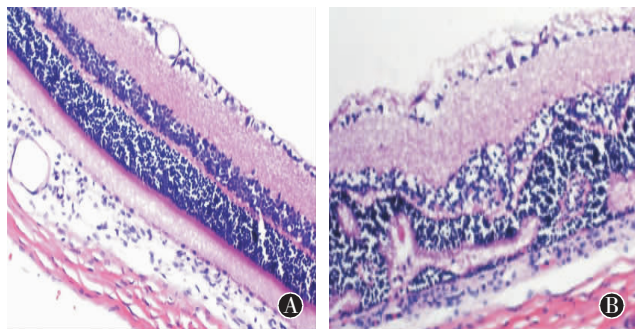
凋亡细胞经 DAB 染色呈棕黄色。对照组视网膜少见凋亡细胞,以外核层为主(见图 2A),凋亡率为(7.0±1.4)%;造模 7、14、28 d,凋亡细胞仍以外核层为主(见图 2B),凋亡率分别为(21.0±3.5)%、(32.3±2.3)%、(41.7±2.6)%。凋亡率随着造模时间的延长呈增加趋势,差异有统计学意义($F=205.27, P < 0.01$)。

2.3 免疫荧光结果

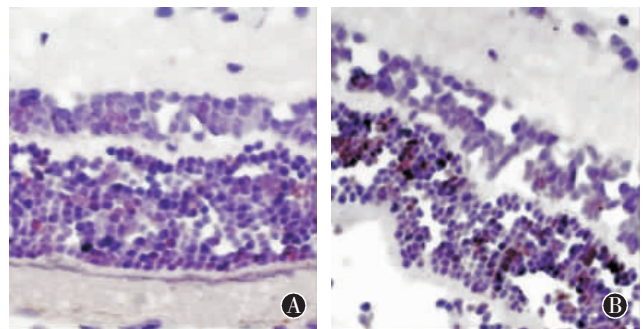
CSPGs 特异性抗体 CS-56 经 FITC 染色为绿色,细胞核经 DAPI 染色为蓝色。对照组 CS-56 在脉络膜、内核层、节细胞层弱阳性表达(见图 3A);造模 7d 组,CS-56 在脉络膜、视锥视杆层、内核层、节细胞层表达(见图 3B);造模 14 d 组,CS-56 表达扩增到外核层(见图 3C);造模 28 d 组,CS-56 表达扩增至外丛状层(见图 3D)。随造模时间延长,各层荧光表达逐渐增强。图 3E 示 CSPGs 表达于细胞膜及细胞外间质上。

2.4 免疫组织化学结果

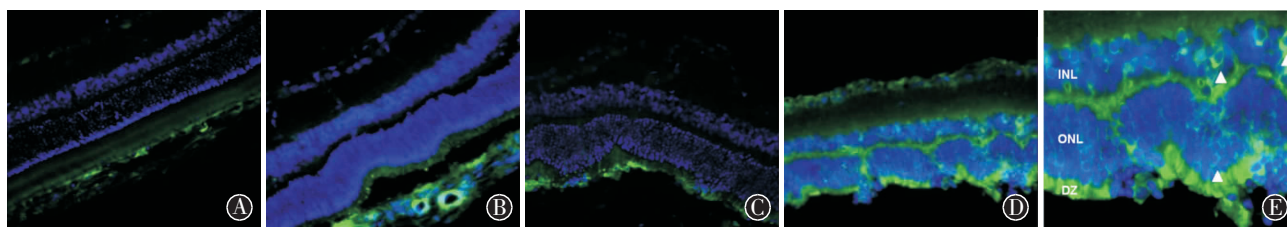
小胶质细胞表达的巨噬细胞特异性抗原 CD68 经 DAB 染色呈棕黄色。对照组 CD68 仅在脉络膜、内核层、节细胞层表达(见图 4A);造模 7 d 组,CD68



A, 对照组视网膜;B, 造模 28 d 视网膜,RPE 细胞消失,内外核层排列紊乱,外节空泡化,部分光感受器细胞向 Bruch 膜迁移,包裹视锥视杆层
图 1 视网膜病理损伤(HE 染色×100)



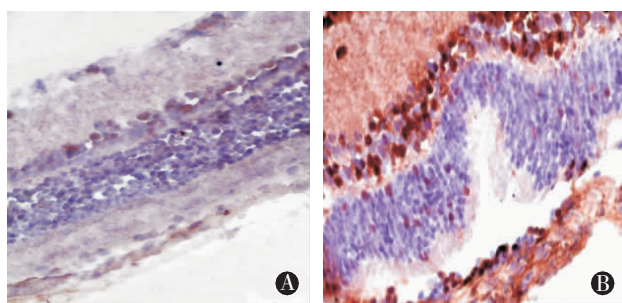
A, 对照组视网膜凋亡细胞少见,呈弱阳性表达;B, 造模 28 d 外核层可见许多凋亡细胞(棕色)
图 2 视网膜凋亡细胞情况(TUNEL 染色×200)



A, 正常对照组, 表达弱阳性; B-D, 分别是造模 7、14、28 d 组, 与对照组相比, CSPGs 表达量逐渐增强、范围逐渐扩大。E, CSPGs 表达于细胞膜及细胞间质上。INL, 内核层; ONL, 外核层; DZ, 视锥视杆层。(CSPGs 绿色标记, 细胞核蓝色标记; 三角形: 表达于细胞膜上的 CSPGs)

图 3 CSPGs 在视网膜的表达情况(间接免疫荧光染色×100)

表达在视锥视杆层附近、内核层、节细胞层; 造模 14 d 组, CD68 表达在视锥视杆层、外核层、内核层、节细胞层; 造模 28 d 组, CD68 表达在脉络膜、视锥视杆层、外核层、内核层、节细胞层(图 4B)。随造模时间延长, CD68 在视网膜各层的表达明显增多, 表达强度也逐渐增加, 分别为: 1.33 ± 0.52 , 2.67 ± 0.82 , 4.00 ± 1.10 , 7.17 ± 1.33 , 各组间差异有统计学意义 ($F=38.45$, $P<0.01$)。

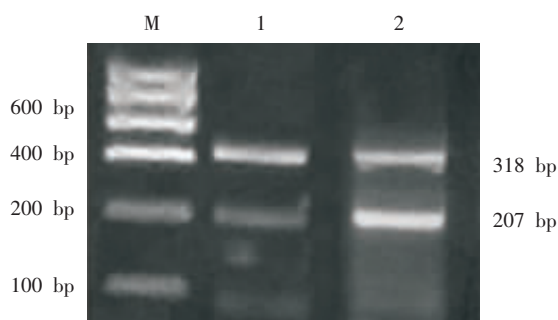


A, 正常对照组, CD68 弱阳性表达; B, 造模 28 d 组, 各层可见许多阳性细胞(棕色)

图 4 视网膜的 CD68 表达情况(二步免疫组织化学染色×200)

2.5 RT-PCR 结果

如图 5 所示: 第 1、2 泳道分别是 Versican mRNA 在正常对照组、28 d 造模组的表达灰度比, 分别为 0.23 ± 0.02 和 1.02 ± 0.06 。28 d 造模组 Versican mRNA 相比正常对照组表达明显升高 ($t=-26.05$, $P<0.01$)。



1, 正常对照组; 2, 造模组

图 5 Versican mRNA 在视网膜上的表达情况

3 讨论

本实验采用 NaIO₃ 诱导的大鼠能在短期内发生视网膜病变, 在目前实验研究中运用较为广泛。NaIO₃ 主要毒理作用是选择性、特异性地损伤 RPE 细胞, 继而引起视网膜结构如光感受器、脉络膜的病变^[6]。造模后大鼠的视网膜结构变化显示, RPE 细胞、视锥视杆层、外核层、内核层相继发生形态学的改变, 并与正常组织相掺杂, 随着时间延长, 病变程度加深。RPE 细胞受到 NaIO₃ 的损伤后, 失去营养、屏障等功能, 进而引起了光感受器渐进性凋亡。TUNEL 检测发现凋亡细胞以外核层为主。通过形态学和凋亡学证实了该模型与人视网膜色素上皮变性疾病有相似之处, 主要病理改变都是 RPE 细胞及其功能的缺失引起光感受器细胞进行性退行病变, 并发生由外向内各层组织的逐渐萎缩变性^[2]。

视网膜变性另一主要的病理特征是神经胶质增生^[2], 形成大量胶质瘢痕。胶质瘢痕作为一道物理屏障, 其间还含有和细胞外基质相关的抑制性物质, 如 CSPGs。大量研究发现 CNS 损伤时, 胶质瘢痕的重要组分 CSPGs 表达量明显上升, 抑制神经元及轴突的再生。经 ChABC 酶降解 CSPGs 后, 可促使视神经损伤的大鼠再生纤维明显增多^[7], 可促进干细胞突破 CSPGs 的屏障作用在视网膜上迁移、整合及分化^[4]。本实验发现, 正常大鼠 CSPGs 的特异性抗体 CS-56 在脉络膜、内核层、节细胞层弱阳性表达。NaIO₃ 造模后, 除内丛状层外, CS-56 逐步在视网膜各层上强阳性表达, 而外核层及内核层除在细胞外间质表达外, 也表达于细胞膜上。这和另一经典视网膜变性动物模型 RCS 大鼠不同, 后者尽管 CSPGs 在视网膜的表达范围和强度都明显大于正常动物, 但仅表达在视网膜视锥视杆层和神经节细胞层^[4]。Versican 是 CSPGs 的 N 末端之一, 在发育及成熟的中枢神经系统中都有表达。CNS 损伤后, Versican 表达增加, 并分布在阻碍轴突再生的微环境中^[8]。RCS 大鼠视锥视杆层及节细胞层中, 也可见大量 Versican 表达^[4]。本实验发

现 NaIO₃ 腹腔注射所致视网膜色素变性动物模型视网膜中 Versican mRNA 表达也显著升高。综上, NaIO₃ 诱导的视网膜色素变性大鼠视网膜 CSPGs 表达范围明显扩大, 表达量显著升高, 提示 CSPGs 参与了 NaIO₃ 诱导的视网膜变性的病理过程, 可能起着物理屏障及抑制轴突再生的化学屏障作用。

视网膜变性是以剧烈的小胶质细胞活化及神经胶质疤痕形成为特征^[9-11]。小胶质细胞是正常 CNS 中最有代表性的免疫细胞^[12], 对视网膜发育具有支持、营养、保护和修复等作用^[13]; 在接受损伤信号刺激后, 细胞数目增多, 转化为具有吞噬能力的细胞, 快速应答视网膜各种损伤变化。本实验对小胶质细胞表达的巨噬细胞特异性抗原 CD68 进行观察, 发现 CD68 散在于正常大鼠脉络膜、内核层及节细胞层, NaIO₃ 造模后, CD68 数目明显增多, 并出现在视锥视杆层及外核层。这可能由于 NaIO₃ 破坏血-视网膜屏障后, 脉络膜上的小胶质细胞迁移到视锥视杆层, 内核层和节细胞层的小胶质细胞受到损伤刺激后, 大量活化、增殖, 并且内核层小胶质细胞也向外核层迁移, 共同修复视网膜损伤。

CNS 损伤后, 星形胶质细胞、少突胶质细胞等活化的多种胶质细胞均参与 CSPGs 的合成^[7]。Singhal 等^[4]研究发现, 在 RCS 大鼠视网膜中小胶质细胞主要定位在 CSPGs 累积的区域, 推测 CSPGs 可能来源于小胶质细胞。本实验也发现小胶质细胞的分布和 CSPGs 的沉积大致在相同区域, 提示 CSPGs 可能来源于小胶质细胞。但本实验与 Singhal 等的研究不同点在于, CSPGs 及小胶质细胞也在内核层表达, 可能是由于大剂量 NaIO₃ 造成视网膜大面积剧烈反应。

本研究发现 NaIO₃ 诱导的 RPE 变性大鼠具有与人视网膜色素上皮变性疾病有相似的病理过程。深入研究色素变性视网膜上 CSPGs 的机制, 对视网膜相关疾病的防治和研究有着重要意义。而 NaIO₃ 腹腔注射后视网膜上高表达的 CSPGs 确切的细胞来源尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Buss A, Pech K, Kakulas BA, et al. NG2 and phosphacan are present in the astroglial scar after human traumatic spinal cord injury. *J BMC Neurol*, 2009, 9:32.
- [2] 何世坤, 赵明威, 陈有信, 等. 视网膜色素上皮基础与临床. 北京: 科学出版社, 2005: 236-241.
- [3] Perissinotto D, Iacopetti P, Bellina I, et al. Avian neuralcrest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/Versican and aggrecan. *Development*, 2000, 127: 2823-2842.
- [4] Singhal S, Lawrence JM, Bhatia B, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans and microglia prevent migration and integration of grafted müller stem cells into degenerating retina. *Stem Cells*, 2008, 26: 1074-1082.
- [5] Rusche B. The 3Rs and animal welfare-conflict or the way forward? *Altex*, 2003, 20(suppl 1): 63-76.
- [6] Franco LM, Zulliger R, Wolf-Schnurrbusch UE, et al. Decreased visual function after patchy loss of retinal pigment epithelium induced by low-dose sodium iodate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 4004-4010.
- [7] 任蕾, 王一. 视神经损伤后 CSPGs 的表达及 chABC 酶降解后对 RGC 存活及视神经再生作用的研究. 重庆: 第三军医大学西南医院眼科, 2005: 1-46.
- [8] Zhang ZW, Zhang JP, Zhou TT, et al. Does the expression of versican isoforms contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases? *Arch Med Res*, 2011, 42: 258-260.
- [9] De Kozak Y, Cotinet A, Goureau O, et al. Tumor necrosis factor and nitric oxide production by resident retinal glial cells from rats presenting hereditary retinal degeneration. *Ocul Immunol Inflamm*, 1997, 5: 89-94.
- [10] Thanos C, Richter W. The migratory potential of vitally labelled microglial cells within the retina of rats with hereditary photoreceptor dystrophy. *Int J Dev Neurosci*, 1993, 11: 671-680.
- [11] Roque RS, Imperial CJ, Caldwell RB. Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37: 196-203.
- [12] Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 2002, 40: 140-155.
- [13] Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, et al. Microglia activated by IL-4 or INF gamma differentially induce neurogenesis and oligodendro genesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 31: 149-160.

(收稿日期: 2011-10-26)

(本文编辑: 季魏红)